

EP/03/4003

REC'D 05 JUN 2003

WIPO

PCT

PA 998777

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

April 24, 2003

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 60/431,173

FILING DATE: December 05, 2002

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

N. Woodson
N. WOODSON

Certifying Officer

12-06-02

AIPRO

12/05/02

Jc849 U.S. PTO

PTO/SB/16 (10-01)

U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Approved for use through 10/31/2002. OMB 0651-0032
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.**PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET**

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53(c).

Express Mail Label No. EV 096 596 750 US

J1036 U 96
60/431173

INVENTOR(S)					
Given Name (first and middle (if any))	Family Name or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)			
<input type="checkbox"/> Additional inventors are being named on the _____ separately numbered sheets attached hereto					
TITLE OF THE INVENTION (500 characters max)					
Komponenten und Verfahren zur spezifischen Hummung von Genen in Augenzellen					
Direct all correspondence to: CORRESPONDENCE ADDRESS <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="width: 45%;"> <input type="checkbox"/> Customer Number OR <input checked="" type="checkbox"/> Firm or Individual Name John P. White </div> <div style="width: 50%; text-align: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">Place Customer Number Bar Code Label here</div> </div> </div>					
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <input type="checkbox"/> Drawing(s) Number of Sheets </div> <div style="width: 50%;"> <input type="checkbox"/> CD(s), Number </div> </div>					
<input type="checkbox"/> Application Data Sheet. See 37 CFR 1.76					
ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)					
<input checked="" type="checkbox"/> Specification Number of Pages 28					
<input checked="" type="checkbox"/> Other (specify) 					
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27. <input checked="" type="checkbox"/> A check or money order is enclosed to cover the filing fees <input checked="" type="checkbox"/> The Commissioner is hereby authorized to charge filing fees or credit any overpayment to Deposit Account Number: 03-3125 <input type="checkbox"/> Payment by credit card. Form PTO-2038 is attached. </div> <div style="width: 20%; text-align: center;"> FILING FEE AMOUNT (\$) <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 100px; margin: 0 auto;">\$80.00</div> </div> </div>					
The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government. <input type="checkbox"/> No. <input type="checkbox"/> Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____					

Respectfully submitted,

SIGNATURE

TYPED or PRINTED NAME

TELEPHONE

John P. White

John P. White

(212) 278-0400

Date

12/05/02

REGISTRATION NO.

(if appropriate)
Docket Number:

28,678

68539-PRO

USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

This collection of information is required by 37 CFR 1.51. The information is used by the public to file (and by the PTO to process) a provisional application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 8 hours to complete, including gathering, preparing, and submitting the complete provisional application to the PTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, Washington, D.C. 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Box Provisional Application, Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Dkt. 68539-PRO/JPW/FHB

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants : Not Yet Known
Serial No. : Not Yet Known
Filed : Herewith
For : Komponenten und Verfahren zur spezifischen
Hemmung von Genen in Augenzellen

1185 Avenue of the Americas
New York, New York 10036
December 5, 2002

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Attn.: BOX PROVISIONAL APPLICATION

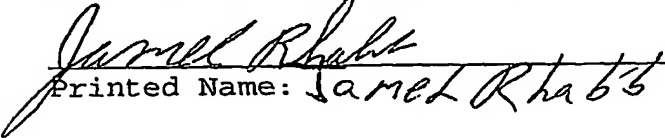
Sir:

EXPRESS MAIL CERTIFICATE OF MAILING
FOR THE ABOVE-IDENTIFIED APPLICATION

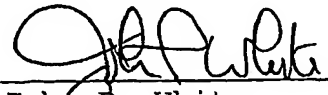
"Express Mail" mailing label number: EV 096 596 750 US

Date of Deposit: December 5, 2002

I hereby certify that this paper or fee is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 C.F.R. §1.10 on the date indicated above and is addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231, Attn.: Box Provisional Application.


Printed Name: Samuel Rhab

Respectfully submitted,


John B. White
Registration No. 28,678
Attorney for the Applicant
Cooper & Dunham LLP
1185 Avenue of the Americas
New York, New York 10036
(212) 278-0400

Komponenten und Verfahren zur spezifischen Hemmung von Genen in Augenzellen

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren, Nukleinsäuren, Organismus, Wirt, Zelle, Zelllinien, Gewebe, Organe, pharmazeutische Zusammensetzung bzw. Medikament, Träger, Vektor zur spezifischen Hemmung von Genen in Zellen und Geweben, insbesondere die sich innerhalb des Auges jenseits der Blut/Retina-Schranke befinden und in den betreffenden Zellen und Geweben spezifisch oder überwiegend exprimiert werden.
- 10 Das menschliche Auge ist ein Organ außerordentlicher Komplexität, dessen Strukturen und Gewebe in ihren jeweils spezifischen Funktionen so aufeinander abgestimmt sind, dass der Vorgang des Sehens vom Eintreffen des Lichtstrahles auf die Linse bis zur Umwandlung in elektrische Impulse und deren Weiterleitung in die für die bewusste Wahrnehmung
- 15 zuständigen Bereiche des Gehirns optimal gewährleistet wird. Insbesondere die Gewebe des Augenhintergrundes wie die mehrschichtige Retina, in der funktionell hochspezialisierte Zelltypen die Umwandlung von Lichtenergie in elektrische Impulse vermitteln, und auch das Retinale Pigmentepithel (RPE) zeichnen sich durch eine sehr hohe Stoffwechselaktivität aus. Die aktive Versorgung der Photorezeptoren mit Nährstoffen aus dem Blutkreislauf und der
- 20 gleichzeitige Abtransport und die Prozessierung von Abbauprodukten des Sehvorganges erfolgt über das RPE, welches wiederum durch die Bruchsche Membran von den Blutgefäßen der Choriokapillaris getrennt ist. Der Stoffaustausch über das RPE und die Bruchsche Membran erfolgt kontrolliert und spezifisch und aufgrund dieser funktionellen Analogie zur Blut/Hirn-Schranke spricht man hier von der Blut/Retina-Schranke.
- 25 Die Aktivität zahlreicher, oft spezifisch exprimierter Gene ist zur Kontrolle und Durchführung des Phototransduktionsprozesses in den Zellen der Retina und des Stoffaustausches über die Blut/Retina-Schranke, darüber hinaus aber auch zur Aufrechterhaltung der Struktur und funktionellen Integrität der zahlreichen Komponenten der Gewebe des Augenhintergrundes notwendig. Dieses einzigartige und hochentwickelte
- 30 System ist daher sehr anfällig für zahlreiche genetische Defekte, die sich in einer großen phänotypischen Bandbreite retinaler Erkrankungen äußert.

Neben der Chorioretinitis und der Herpesretinitis, die als erworbene Formen retinaler Erkrankungen betrachtet werden können, lässt sich die überwiegende Zahl retinaler Krankheitsbilder auf eine genetische Disposition zurückführen. Dazu gehören beispielsweise die primäre Netzhautablösung (Ablatio retinae), das Retinoblastom, das retinale Astrocytom (Bourneville Pringle), Angiomatosis retinae (Hippel-Lindau), die Coats-Erkrankung (Retinitis exsudativa), die Eales Erkrankung, Retinopathia centralis serosa, Okulärer Albinismus, Retinitis pigmentosa, Retinitis punctata albescens, das Usher Syndrom, die Lebersche Kongenitale Amaurose, die Zapfendystrophie, die Vitelliforme Makula-Degeneration (Morbus Best), die Juvenile Retinoschisis, die North Carolina Macula-Dystrophie, die Sorsby Fundus-Dystrophie, die Doyne'sche Honigwaben Retinal-Dystrophie (Malattia leventinese), Morbus Stargardt, die Wagnersche Vitreoretinale Degeneration und die Altersbedingte Makula-Degeneration (AMD).

Während es bei der Aufklärung der Ursachen monogener Retinopathien wie Morbus Best oder Morbus Stargardt in letzter Zeit beeindruckende Fortschritte gab, ist der heutige Kenntnisstand über die oft komplexen molekularen Stoffwechselzusammenhänge, welche dem charakteristischen Krankheitsbild multifaktoriell bedingter retinaler Erkrankungen zugrundeliegen, nur sehr gering. Im Folgenden wird exemplarisch auf die AMD als komplexe Augenerkrankung mit genetischer Komponente und den damit zusammenhängenden technischen Problemen in Bezug auf die Erforschung der molekularen Ursachen und der Entwicklung diagnostischer und pharmakologischer Interventionsstrategien eingegangen werden.

Bei der AMD, die zu den retinalen Degenerationen gezählt wird, handelt es sich um die häufigste Erblindungsursache im fortgeschrittenen Lebensalter in der entwickelten Welt. Die Prävalenz steigt von 9% bei Personen in einem Alter von mehr als 52 Jahren bis auf mehr als 25% bei den über 75-Jährigen (Paetkau et al. 1978, Leibowitz et al. 1980, Banks und Hutton 1981, Ghafour et al. 1983, Hyman 1987, Hyman et al. 1983, Grey et al. 1989, Yap und Weatherill 1989, Heiba et al. 1994).

AMD ist eine komplexe Erkrankung, die sowohl durch endogene, als auch durch exogene Faktoren ausgelöst wird (Meyers und Zachary 1988; Seddon et al. 1997). Neben den Umweltfaktoren werden noch verschiedene persönliche Risikofaktoren wie Hypermetropie, helle Haut- und Irisfärbung, erhöhter Serum-Cholesterinspiegel, Bluthochdruck oder

Zigarettenrauchen vorgeschlagen (Hyman et al. 1983, Klein et al. 1993, Sperduto und Hiller 1986, The Eye Disease Case-Control Study Group 1992, Bressler und Bressler 1995). Eine genetische Komponente als Grundlage der AMD wurde von verschiedenen Gruppen dokumentiert (Gass 1973, Piguet et al. 1993, Silvestri et al. 1994) und führte zu der Hypothese, dass die Krankheit in entsprechend genetisch prädisponierten Personen durch Umwelt- und individuelle Faktoren begünstigt werden kann.

Aufgrund der Komplexität des Krankheitsbildes kann davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der bisher unbekannten Gene groß ist, die, wenn sie mutiert sind, zur Anfälligkeit für AMD beitragen.

Das technische Problem, das dieser Erfindung zugrundeliegt, besteht nun zum einen darin, dass eine gezielte Applikation von Wirkstoffen in das Auge und insbesondere in den Augenhintergrund aufgrund der Struktur des menschlichen Auges aufwendig ist, mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist und mit Spätfolgen zu rechnen ist. Eine direkte Applikation beispielsweise durch Injektion in den Augenhintergrund ist für die betroffenen Personen sehr unangenehm, insbesondere dann, wenn eine Behandlung mehrmals oder chronisch erforderlich ist. Ferner ist eine direkte Applikation in den Bulbus mit erheblichen Nebenwirkungen bzw. mittelfristig auftretenden Sekundärerkrankungen wie Katarakt und Glaukom verbunden. Eine systemische Applikation zeigt dagegen in der Regel Nebenwirkungen außerhalb des Zielorgans Auge – oft ohne dass der Wirkstoff in signifikanten Mengen im Augenhintergrund des inneren Auges nachweisbar ist. Selbst bei ausreichender Targetspezifität, die das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen bei einer systemischen Applikation gering halten würde, bleibt diese Art der Applikation ineffizient, da sich die Zielgewebe und Zielzellen jenseits der Blut/Retina-Schranke befinden und der Wirkstoff aufgrund der stringenten Aktivität dieser Schranke nicht an seinen Wirkort gelangen kann.

30 Zur Zeit auf dem Markt verfügbare Medikamente zur Behandlung ophthalmologischer Erkrankungen stehen daher nahezu ausschließlich zur Behandlung der klinischen Symptome des vorderen Auges zur Verfügung, da hier eine Applikation über Augentropfen relativ leicht möglich ist.

Eine kausale Therapie insbesondere der hinteren Augenabschnitte ist mit Ausnahme oben beschriebener und mit Nebeneffekten verbundener Injektionen nicht möglich.

Das technische Problem besteht zum anderen in der Schwierigkeit der Anwendung konventioneller experimenteller Strategien zur Identifikation von Genen, die für retinale Erkrankungen ursächlich sind, und deren Validierung als Targets zur Diagnose und für pharmakologische Interventionsstrategien. Dies gilt insbesondere für die AMD, da bei dieser Erkrankung die Symptome erst spät, in der Regel in der 7. Lebensdekade, auftreten. Das Wissen über pathologische Stoffwechselzusammenhänge aufgrund der eingeschränkten oder fehlenden Funktion einzelner oder mehrerer dafür ursächlicher Gene etwa bei der AMD oder bei anderen retinalen Krankheitsbildern reicht nach bisherigem Kenntnisstand zur medikamentösen Behandlung solcher Krankheiten nicht aus. Geeignete Tier- oder Zellkulturmodelle für derartige Erkrankungen fehlen auf Grund der Komplexität der Erkrankung und entsprechender einfacher Interventions- und Manipulationsmöglichkeiten am Auge.

Als essentielles Sinnesorgan ist das Auge durch natürliche Barrieren (Tränensekretion, Enzyme, Transportvorgänge, Blut/Retina-Schranke) gegen äussere schädliche Einflüsse geschützt, die aber gleichzeitig auch eine Schranke für die Applikation von Medikamenten darstellen. Wie die Blut/Hirn-Schranke stellt die Blut/Retina-Schranke eine physiologische Barriere für die Aufnahme von Medikamenten in das Augeninnere dar und macht eine pharmakologische Therapie von okulären Erkrankungen nach dem derzeitigen Stand der Technik – wenn überhaupt – nur sehr schwer möglich. Dies gilt zum Beispiel auch für die Applikation von sogenannten einzelsträngigen Antisinn-Oligonukleotiden für die Inhibition der Expression von Ziel-Genen, deren Anwendung im Auge eine intravitreale Injektion erforderlich macht. Die Überwindung der Blut/Retina-Schranke stellt somit ein technisches Problem bei der Therapie okulärer Erkrankungen durch spezifische Inhibition der Proteinexpression im Augengewebe dar.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes Verfahren sowie Komponenten zur Behandlung von Augenerkrankungen bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird mit dem entsprechenden Gegenstand der Patentansprüche gelöst.

Der Grundgedanke der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur spezifischen Hemmung der Expression von Zielgenen in Zellen und Geweben des Auges mit den folgenden Verfahrensschritten:

- Einführen von ein oder mehreren doppelsträngigen Oligoribonukleotiden (dsRNA) außerhalb der Retina, insbesondere des Auges,
 - Hemmung der Expression der korrespondierenden mRNA eines oder mehrerer Zielgene durch RNA-Interferenz,
 - Degradation der korrespondierenden mRNA eines oder mehrerer Zielgene
 - Bereitstellung und Aufrechterhaltung einer Testzelle oder eines Testgewebes, in der/denen die korrespondierende mRNA eines oder mehrerer Zielgene degradiert ist/sind, und
 - Beobachtung und Vergleich des entstandenen Phänotyps der hergestellten Testzelle oder des Testgewebes mit demjenigen einer geeigneten Kontrollzelle oder eines Kontrollgewebes, um Informationen über die Funktionen der Gene zu erhalten.
- 15 Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Medikament bzw. eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein oder mehrere doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) enthält, die mittels RNA-Interferenz die korrespondierende mRNA eines oder mehrerer Zielgene in der Expression hemmen, deren eingeschränkte Funktionen für eine Augenerkrankung ursächlich sind, und die außerhalb der Blut/Retina-Schranke, insbesondere
- 20 außerhalb des Auges, angewendet wird.

Die überraschenden Vorteile der Erfindung sind, dass entgegen der weitläufigen Fachmeinung gezeigt werden konnte, dass erfindungsgemäße Wirkstoffe die Blut/Retina-Schranke als physiologische Barriere überwinden können, so dass eine systemische oder

25 lokale Applikation außerhalb des Augenninneren für eine gezielte Behandlung einer Krankheit des Augenhintergrundes und damit eine verbesserte Therapie möglich ist.

Gleichzeitig werden die Nebenwirkungen, die mit einer direkten Applikation, z.B. durch Injektion, aufgrund der Struktur des menschlichen Auges verbunden sind und die für die betroffenen Personen, insbesondere bei mehrmaligen oder chronischen Behandlungen, sehr unangenehm und mit Langzeitfolgen wie z.B. Katarakt und Glaukom verbunden sind, erfindungsgemäß reduziert.

30

Die Lösung des technischen Problems besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zur spezifischen Intervention in Erkrankungen des Augenhintergrundes auf der molekularen Ebene, ohne dass eine direkte Applikation in den Augenhintergrund notwendig ist. Mit der vorliegenden Erfindung wird das weite, bislang nicht oder nur unzulänglich adressierbare
 5 Therapiefeld von Erkrankungen des Augeninneren und des Augenhintergrundes umfänglich erschlossen. Die Intervention beruht auf einer Hemmung spezifisch oder überwiegend in den Geweben des Auges bzw. Augenhintergrundes exprimierter Gene, dadurch gekennzeichnet, dass die hierzu benötigten Wirkstoffe die Blut/Retina-Schranke überwinden können, so dass eine systemische oder lokale Applikation außerhalb des Augeninneren für eine gezielte
 10 Behandlung einer Krankheit des Augenhintergrundes möglich ist.

Mit der gleichen Methode lassen sich einfach und schnell aussagefähige Tiermodelle generieren, welche die Symptome der überwiegend genetisch bedingten Erkrankungen des Augeninneren nachbilden. Diese Tiermodelle sind geeignet den Entwicklungsprozeß
 15 entsprechender spezifischer Pharmazeutika für die Ophthalmologie zu initiieren und Produkte zu validieren.

Weitere Vorteile und bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind der Beschreibung entnehmbar.

20 Die Lösung des dieser Erfindung zugrundeliegenden technischen Problems besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zur spezifischen Hemmung von Genen, deren aberrante Funktionen ursächlich im Zusammenhang mit monogenen oder mit multifaktoriell bedingten Augenerkrankungen stehen. Hierzu kann beispielsweise die AMD als eine Form einer
 25 degenerativen retinalen Erkrankung gezählt werden.

Ein Verfahren zur spezifischen Hemmung von Genen durch doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) ist aus der WO 01/75164 bekannt. Die Offenbarung dieser Anmeldung wird hiermit in die vorliegende Beschreibung aufgenommen.

30 In dieser Anmeldung wird beschrieben, dass doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) nach der Einführung in die Zielzellen die spezifische Degradation von mRNA induzieren. Die Spezifität dieses Vorganges wird vermittelt durch die Komplementarität eines der beiden dsRNA-Stränge zur mRNA des Zielgens.

Der Prozess des genspezifischen, post-transkriptionellen Abschaltens von Genen durch dsRNA-Moleküle wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. Diese Bezeichnung wurde ursprünglich von Fire und Mitarbeitern geprägt, um die Beobachtung zu beschreiben, dass die Einführung von dsRNA-Molekülen in den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* die Genexpression blockiert (Fire et al., 1999). Nachfolgend konnte RNAi auch an Pflanzen, Protozoen, Insekten (Kasschau und Carrington 1998) und kürzlich auch an Säugerzellen gezeigt werden (Caplen et al., 2001; Elbashir et al., 2001). Der Mechanismus, durch den RNAi die Genexpression unterdrückt, ist noch nicht vollständig verstanden. Aus Untersuchungen an Nicht-Säugerzellen ist bekannt, dass dsRNA-Moleküle durch endogene Ribonukleasen in kleine interferierende RNA-Moleküle (siRNA-Moleküle) umgewandelt werden (Bernstein et al., 2001; Grishok et al., 2001; Hamilton and Baulcombe, 1999; Knight and Bass, 2001; Zamore et al., 2000). Die 21 bis 23 bp langen siRNA-Moleküle sind somit die eigentlichen Mediatoren für den Abbau der mRNA des Zielgens.

15

Zur spezifischen Hemmung eines Zielgens genügt es, dass das doppelsträngige Oligoribonukleotid eine zum Zielgen identische Sequenz mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden (Basenpaaren) aufweist.

20 In der vorliegenden Erfindung werden doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) verwendet, welche nach der Applikation die Blut/Retina-Schranke überwinden, um durch RNA-Interferenz der korrespondierenden mRNA-Moleküle die Hemmung der Zielgene in den Zielzellen hervorzurufen. Die vorliegende Erfindung umfasst weiterhin ein Medikament aus dsRNA-Molekülen zur spezifischen Behandlung genetisch bedingter Augenerkrankungen.

25 Mit der vorliegenden Erfindung wird das weite, bislang nicht oder nur unzulänglich adressierbare Therapiefeld von Erkrankungen des Augeninneren und des Augenhintergrundes erschlossen.

30 Das in dieser Erfindung beschriebene Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass dsRNA-Moleküle, vorzugsweise in der o.g. Länge nach systemischer oder lokaler Applikation außerhalb des Augapfels im Inneren des Auges nachweisbar sind. Die Nachweisbarkeit beruht auf der spezifischen Hemmung von vorgegebenen Zielgenen in Zellen oder Geweben des Augeninneren durch RNA-Interferenz.

Aufgrund der spezifischen Funktionen der Zellen des retinalen Gewebes und des RPE wird vermutet, dass Gene, deren aberrante Funktion ursächlich sind für Krankheiten des Augenhintergrundes, in den Geweben und Zellen des Augenhintergrundes spezifisch exprimiert werden und somit bevorzugte Ziele für medikamentöse Interventionen darstellen.

5

Der Kern der vorliegenden Erfindung ist insofern überraschend, dass dsRNA-Moleküle einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden in der Lage sind, nach einer systemischen Applikation, beispielsweise durch intravenöse Injektion, die Blut/Retina-Schranke zu überwinden und in den Geweben des Augenhintergrundes Zielgene spezifisch zu inaktivieren. Diese Überwindung der Blut/Retina-Schranke ist um so bemerkenswerter, da die Überwindung der Blut/Hirn-Schranke durch dsRNA bislang in keinem Experiment gezeigt werden konnte.

Das Verfahren, welches unten durch Ausführungsbeispiele erläutert wird, eignet sich somit zur Bereitstellung eines Tiermodells mit den Targets, deren eingeschränkte Funktion für Krankheiten im Auge ursächlich sind, identifiziert und validiert werden können. Das Verfahren eignet sich darüber hinaus zur spezifischen Intervention in Augenerkrankungen auf molekularer Ebene, ohne dass eine direkte Applikation in den Augenhintergrund notwendig ist. Durch die Spezifität der RNAi zur Hemmung spezifisch in den Zielzellen exprimierter Gene ist das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen gering.

20

Diese und andere Ausführungsformen sind in der vorliegenden Beschreibung und in den Beispielen offenbart und umfasst. Literatur bezüglich der erfindungsgemäß zu verwendenden Materialien, Verfahren, Verwendungen und Verbindungen können mittels öffentlichen Bibliotheken und Datenbanken bezogen werden, beispielsweise mittels der Verwendung von elektronischen Hilfsmitteln. Beispielsweise kann die öffentliche Datenbank „Medline“ benutzt werden, die von dem National Center for Biotechnology Information und/oder der National Library of Medicine at the National Institutes of Health unterhalten wird. Weitere Datenbanken und Internetadressen, wie die des European Bioinformatics Institute (EBI), das Teil des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) ist, sind dem Fachmann bekannt und können auch durch die Verwendung von Internetsuchmaschinen aufgefunden werden. Eine Übersicht über Patentinformationen in der Biotechnologie und eine Übersicht von relevanten Quellen für Patentinformationen, die für die retrospektive Suche und der Vergegenwärtigung nützlich sind, sind in Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364 beschrieben.

Die vorstehende Offenbarung beschreibt allgemein die vorliegende Erfindung. Ein umfassenderes Verständnis der Erfindung kann durch Bezugnahme auf die folgenden spezifischen Beispiele erhalten werden, die lediglich zum Zwecke der Illustration zur Verfügung gestellt werden und nicht gedacht sind den Umfang der Erfindung einzuschränken.

5 Der Inhalt aller zitierten Referenzen (einschl. Literaturreferenzen, erteilte Patente, veröffentlichte Patentanmeldungen wie sie im Text zitiert sind und Herstellerbeschreibungen und Angaben, etc.) ist hier explizit durch Bezugnahme enthalten; jedoch ist dies kein Zugeständnis, dass irgendeines dieser Dokumente Stand der Technik für die vorliegende Erfindung ist.

10

Zur Ausführung der vorliegenden Erfindung können, wenn nicht anders dargestellt, konventionelle Techniken der Zellbiologie, Zellkultur, Molekularbiologie, transgenen Biologie, Mikrobiologie, rekombinante DNA und RNA Technologie verwendet werden, die zum Handwerkzeug des Fachmann gehören. Solche Techniken sind umfassend in der

15 Literatur erklärt, siehe beispielsweise Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells

20 And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical

25 Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986).

Ausführungsbeispiele

Modellhaft wird die Inhibition der Expression des grün-fluoreszierenden Proteins (eGFP) im
5 retinalen Pigmentepithel (RPE) und der Retina von transgenen Mäusen (FVB.Cg-
Tg(GFPU)5Nagy, The Jackson Laboratory) durch dsRNA-Moleküle analysiert.

Das Beispiel 1 beschreibt das spezifische *post transcriptional gene silencing* durch dsRNA
gegen das Ziel-Gen eGFP im Maus-Tiermodell, wobei die optimale dsRNA-Konzentration
zum *post transcriptional gene silencing* für die systemische Applikation bestimmt werden soll
10 (Versuchsschema 1). Für die Durchführung werden transgene Mäuse, die die *enhanced* Form
des grünfluoreszierenden Proteins (eGFP) in ihren Körperzellen exprimieren, *in vivo* durch
systemische Applikation mit dsRNA Oligoribonukleotid-Molekülen gegen das Ziel-Gen
eGFP behandelt. Bei Kontrolltieren erfolgt ebenfalls eine systemische Behandlung mit
unspezifischen dsRNA-Molekülen gegen das Luziferase GL2-Gen. Zwecks *post*
15 *transcriptional gene silencing* wird den nicht analgetisierten und nicht narkotisierten Tieren
täglich (1. Behandlungstag: Tag 0, letzter Behandlungstag: Tag 20) 20, 100 oder 200 µg
eGFP-spezifische dsRNA/kg Körpergewicht (KG) und der Kontrollgruppe 200 µg Luziferase-
spezifische dsRNA/kg KG in die Schwanzvene i.v. injiziert. Eine mit ddH₂O-behandelte
Kontrollversuchstiergruppe (tägliche i.v.-Injektion von 0,5 ml ddH₂O in Schwanzvene) wird
20 mitgeführt. Jede Versuchstiergruppe besteht aus 8 Tieren, das Injektionsvolumen/Injektion
beträgt maximal 0,5 ml. Am Tag 21 erfolgt die Sakrifizierung der Tiere durch CO₂-
Inhalation.

Die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins im Auge unbehandelter und behandelter
Mäuse wird immunhistologisch (spontane eGFP-Fluoreszenz: fluoreszenzmikroskopische
25 Auswertung; eGFP-spezifische Immunfluoreszenzfärbung: fluoreszenzmikroskopische
Auswertung; eGFP-spezifische DAB-Färbung: lichtmikroskopische Auswertung) untersucht.

Das Beispiel 2 beschreibt das spezifische *post transcriptional gene silencing* durch dsRNA
30 gegen das Ziel-Gen eGFP im Maus-Tiermodell, wobei der optimale Wirkungszeitpunkt (=
Zeitpunkt des maximalen *gene silencing*-Effekts) nach einmaliger systemischer dsRNA-
Injektion i.v. in Schwanzvene des *post transcriptional gene silencing* für die systemische
Applikation bestimmt werden soll (Versuchsschema 2). Für die Durchführung werden
transgene Mäuse, die die *enhanced* Form des grünfluoreszierenden Proteins (eGFP) in ihren

Körperzellen exprimieren, *in vivo* durch systemische Applikation mit dsRNA Oligoribonukleotid-Molekülen gegen das Ziel-Gen eGFP behandelt. Bei Kontrolltieren erfolgt ebenfalls eine systemische Behandlung mit unspezifischen dsRNA-Molekülen gegen das Luziferase GL2-Gen. Zwecks *post transcriptional gene silencing* wird den nicht analgetisierten und nicht narkotisierten Tieren einmalig am Tag 0 200 µg eGFP-spezifische dsRNA/kg Körpergewicht (KG) und der Kontrollgruppe 200 µg Luziferase-spezifische dsRNA/kg KG in die Schwanzvene i.v. injiziert. Jede Versuchstiergruppe besteht aus 8 Tieren, das Injektionsvolumen/Injektion beträgt maximal 0,5 ml. Am Tag 2, 3, 5, und 10 nach der i.v.-Injektion erfolgt die Sakrifizierung der Tiere durch CO₂-Inhalation.

10 Die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins im Auge unbehandelter und behandelter Mäuse wird immunhistologisch (spontane eGFP-Fluoreszenz: fluoreszenzmikroskopische Auswertung; eGFP-spezifische Immunfluoreszenzfärbung: fluoreszenzmikroskopische Auswertung; eGFP-spezifische DAB-Färbung: lichtmikroskopische Auswertung) untersucht.

Das Beispiel 3 beschreibt das spezifische *post transcriptional gene silencing* durch dsRNA gegen das Ziel-Gen eGFP im Maus-Tiermodell, wobei die optimale dsRNA-Konzentration zum *post transcriptional gene silencing* für die lokale (retrobulbäre) Applikation bestimmt werden soll (Versuchsschema 3) . Für die Durchführung werden transgene Mäuse, die die *enhanced* Form des grünfluoreszierenden Proteins (eGFP) in ihren Körperzellen exprimieren, *in vivo* durch retrobulbäre Applikation mit dsRNA Oligoribonukleotid-Molekülen gegen das Ziel-Gen eGFP behandelt. Bei Kontrolltieren erfolgt ebenfalls eine retrobulbäre Injektion mit unspezifischen dsRNA-Molekülen gegen das Luziferase GL2-Gen. Zwecks *post transcriptional gene silencing* wird den analgetisierten und narkotisierten Tieren einmalig (1. Behandlungstag: Tag 0) 20, 100, 200 µg eGFP-spezifische dsRNA/kg Körpergewicht (KG) und der Kontrollgruppe 200 µg Luziferase-spezifische dsRNA/kg KG retrobulbär injiziert. Jede Versuchstiergruppe besteht aus 8 Tieren, das Injektionsvolumen/Injektion beträgt maximal 0,1 ml. Die retrobulbäre dsRNA-Injektion erfolgt sowohl am linken als auch am rechten Auge. Am Tag 3 erfolgt die Sakrifizierung der Tiere durch CO₂-Inhalation.

Die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins im Auge unbehandelter und behandelter Mäuse werde immunhistologisch (spontane eGFP-Fluoreszenz: fluoreszenzmikroskopische Auswertung; eGFP-spezifische Immunfluoreszenzfärbung: fluoreszenzmikroskopische Auswertung; eGFP-spezifische DAB-Färbung: lichtmikroskopische Auswertung) untersucht.

Das Beispiel 4 beschreibt das spezifische *post transcriptional gene silencing* durch dsRNA

gegen das Ziel-Gen eGFP im Maus-Tiermodell, wobei der optimale Wirkungszeitpunkt (= Zeitpunkt des maximalen *gene silencing*-Effekts) nach einmaliger retrobulbärer dsRNA-Injektion des *post transcriptional gene silencing* für die lokale (retrobulbäre) Applikation bestimmt werden soll (Versuchsschema 4). Für die Durchführung werden transgene Mäuse, die die *enhanced* Form des grünfluoreszierenden Proteins (eGFP) in ihren Körperzellen exprimieren, *in vivo* durch retrobulbäre Injektion mit dsRNA Oligoribonukleotid-Molekülen gegen das Ziel-Gen eGFP behandelt. Bei Kontrolltieren erfolgt ebenfalls eine retrobulbäre Applikation von unspezifischen dsRNA-Molekülen gegen das Luziferase GL2-Gen. Zwecks *post transcriptional gene silencing* wird den analgetisierten und narkotisierten Tieren einmalig am Tag 0 200 µg eGFP-spezifische dsRNA/kg Körpergewicht (KG) und der Kontrollgruppe 200 µg Luziferase-spezifische dsRNA/kg KG retrobulbär injiziert. Jede Versuchstiergruppe besteht aus 8 Tieren, das Injektionsvolumen/Injektion beträgt maximal 0,1 ml. Die retrobulbäre dsRNA-Injektion erfolgt sowohl am linken als auch am rechten Auge. Am Tag 2, 3, 5, und 10 nach der retrobulbären Injektion erfolgt die Sakrifizierung der Tiere durch CO₂-Inhalation.

Die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins im Auge un behandelter und behandelter Mäuse wird immunhistologisch (spontane eGFP-Fluoreszenz: fluoreszenzmikroskopische Auswertung; eGFP-spezifische Immunfluoreszenzfärbung: fluoreszenzmikroskopische Auswertung; eGFP-spezifische DAB-Färbung: lichtmikroskopische Auwertung) untersucht.

Das Beispiel 5 beschreibt das spezifische *post transcriptional gene silencing* durch dsRNA gegen das Ziel-Gen eGFP im Maus-Tiermodell, wobei die dsRNA-Wirkung zum *post transcriptional gene silencing* für die wiederholte, lokale (retrobulbäre) Applikation bestimmt werden soll (Versuchsschema 5). Für die Durchführung werden transgene Mäuse, die die *enhanced* Form des grünfluoreszierenden Proteins (eGFP) in ihren Körperzellen exprimieren, *in vivo* durch retrobulbäre Applikation mit dsRNA Oligoribonukleotid-Molekülen gegen das Ziel-Gen eGFP behandelt. Bei Kontrolltieren erfolgt ebenfalls eine retrobulbäre Injektion von unspezifischen dsRNA-Molekülen gegen das Luziferase GL2-Gen. Zwecks *post transcriptional gene silencing* wird den analgetisierten und narkotisierten Tieren am Tag 0, 7 und 14 (1. Behandlungstag: Tag 0, letzter Behandlungstag: Tag 14) 200 µg eGFP-spezifische dsRNA/kg Körpergewicht (KG) und der Kontrollgruppe 200 µg Luziferase-spezifische dsRNA/kg KG retrobulbär injiziert. Jede Versuchstiergruppe besteht aus 8 Tieren, das Injektionsvolumen/Injektion beträgt maximal 0,1 ml. Die retrobulbäre dsRNA-Injektion erfolgt sowohl am linken als auch am rechten Auge. Am Tag 15 erfolgt die Sakrifizierung der

Tiere durch CO₂-Inhalation.

- Die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins im Auge unbehandelter und behandelter Mäuse wird immunhistologisch (spontane eGFP-Fluoreszenz: fluoreszenzmikroskopische Auswertung; eGFP-spezifische Immunfluoreszenzfärbung: fluoreszenzmikroskopische Auswertung; eGFP-spezifische DAB-Färbung: lichtmikroskopische Auswertung) untersucht.

dsRNA-Konstrukte und Plasmide:

- Für das Design der dsRNA-Moleküle wurden Sequenzen vom Typ AA(N19)TT (wobei N ein beliebiges Nukleotid darstellt) aus der Sequenz der Ziel-mRNA ausgewählt, um 21 Nukleotide (nt) lange Sinn- und Anti-Sinn-Stränge mit symmetrischen zwei Nukleotide langen 3'-Überhängen zu erhalten. In den 3'-Überhängen wurde 2'-deoxy-Thymidin anstelle von Uridin verwendet. Um zu gewährleisten, dass die dsRNA-Moleküle ausschliesslich gegen das Ziel-Gen gerichtet sind, werden die ausgewählten dsRNA Sequenzen in einer BLAST-Analyse gegen das Maus Genom getestet. Die 21-nt RNA-Moleküle werden chemisch synthetisiert und gereinigt. Für die Duplex-Bildung werden jeweils 100 µg der Sinn- und Antisinn-Oligoribonukleotide in 10 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl (pH 7,0) gemischt, auf 95°C erwärmt und über einen Zeitraum von 18 Stunden auf Raumtemperatur herabgekühlt. Die dsRNA-Moleküle werden mit Ethanol präzipitiert und in sterilem dd H₂O resuspendiert. Die Endkonzentration beträgt 0,5 mg/mL. Die Integrität und der Doppelstrang-Charakter der dsRNA wird durch Gelelektrophorese verifiziert. Alternativ werden dsRNA-Moleküle von kommerziellen Anbietern bezogen. Die Sequenzen der Ziel-Gene und der entsprechenden dsRNA-Moleküle sind wie folgt:

GFP dsRNA

- | | | |
|----|-------------------|---|
| 25 | DNA Ziel-Sequenz: | 5' CGG CAA GCT GAC CCT GAA GTT CAT
Kodierende Region, 122 - 142 relativ zum ersten Nukleotid des Startkodons (Acc. Nr. X65324) |
| | dsRNA (Sinn) | 5' GCA AGC UGA CCC UGA AGU UCA U |
| | dsRNA (Anti-Sinn) | 5' GAA CUU CAG GGU CAG CUU GCC G |

30 *Luziferase GL2 dsRNA (non silencing dsRNA, Kontrolle)*

- | | | |
|--|-------------------|---|
| | DNA Ziel-Sequenz: | 5' AAC GTA CGC GGA ATA CTT CGA
Kodierende Region, 153 - 173 relativ zum ersten Nukleotid des Startkodons (Acc. Nr. X65324) |
| | dsRNA (Sinn) | 5' CGU ACG CGG AAU ACU UCG Ad(TT) |

dsRNA (Anti-Sinn) 5' UCG AAG UAU UCC GCG UAC Gd(TT)

Analgesie und Narkose der Mäuse:

Zur systemischen Applikation werden die Tiere fixiert und die dsRNAs i.v. in die Schwanzvene (maximales Injektionsvolumen: 0,5 ml) injiziert, wobei von einer Analgesie oder Narkose abgesehen wird, da diese die Tiere stärker belasten würden, als die i.v.-Injektion selbst. Zur retrobulbären Injektion (maximales Injektionsvolumen: 0,1 ml) werden die Tiere allerdings einer kurzfristigen Isofluran-Inhalationsnarkose unterzogen und mit Metamizol-Natrium analgetisch versorgt. Dann werden die Tiere in ihrer gewohnten Umgebung im Tierstall gehalten. Nach dem Abschluss der *in vivo* Diagnostik (das Tierversuchsende ist dem jeweiligen Beispiel 1 - 5 zu entnehmen) werden die Tiere durch CO₂-Inhalation getötet, enukleiert und die Augen histologisch (Immunhistologie) befundet.

Untersuchung der eGFP Expression im retinalen Pigmentepithel und der Retina:

Nach der Entnahme werden die Augen 24 Stunden lang in Methyl-Carnoy-Lösung fixiert. Die fixierten Präparate werden anschliessend nach Standardmethoden in einer aufsteigenden Isopropanolreihe entwässert und über das Intermedium Methylbenzoat in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms werden standardmäßig 5 bis 7 µm dicke Serienschritte hergestellt, in einem geheizten Wasserbad gestreckt und auf Polylysin-beschichtete Objektträger verbracht. Danach werden die Schnitte für 2 Stunden im Brutschrank bei einer Temperatur von 52 °C getrocknet. Die getrockneten Schnitte werden in Xylol entparaffiniert, in eine absteigende Alkoholreihe und anschliessend in Tris/HCl pH 7,4 überführt. Nach dem Blockieren werden die Schnitte für 2 Stunden mit dem primären anti-eGFP Antiserum (polyklonales Ziegen anti-eGFP Antiserum, Santa Cruz Nr. sc-5384) inkubiert. Die Detektion erfolgt mittels Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines Cy2-gekoppelten Kaninchens anti-Ziegen IgG (Dianova, Nr. 305-225-045) oder lichtmikroskopische durch die DAB-Färbungsmethode (Verwendung von biotiniliertem anti-Ziegen IgG (Santa Cruz, Nr. sc-2042), Avidin-D-Peroxidase (Linaris), DAB-Reagenz-Kit (Vector Systems)). Nach dem Gegenfärben mit Haemalaun werden die Proben eingebettet und anschliessend mit einem Eclipse TE-2000-S Mikroskop (Nikon), ausgestattet mit einem 20x und 40x/1.3 Objektiv, mikroskopiert. Die spontane, eGFP-spezifische Fluoreszenz wird in entparaffinisierten, unbehandelten Schnitten mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Versuchsschemata

Versuchsschema 1: systemische siRNA-Applikation. Bestimmung der optimalen dsRNA-Konzentration zum *post transcriptional gene silencing*.

Gruppe	Substanz	Anzahl der Tiere
unbehandelte Tiere	ddH ₂ O	8
Negativkontrolle 200 µg dsRNA/kg KG	<i>non silencing</i> dsRNA (Luziferase-spez. dsRNA)	8
20 µg dsRNA/kg KG	eGFP-spezifische dsRNA	8
100 µg dsRNA/kg KG	eGFP-spezifische dsRNA	8
200 µg dsRNA/kg KG	eGFP-spezifische dsRNA	8
Tiere pro Experiment		40

5

Versuchsschema 2: systemische siRNA-Applikation zur Bestimmung des optimalen Wirkungszeitpunktes des *post transcriptional gene silencing* (= Zeitpunkt des maximalen *gene silencing*-Effekts nach einmaliger systemischen dsRNA-Injektion i.v. in Schwanzvene) am Tag 0.

10

Gruppe	Substanz	Versuchsende nach	Anzahl der Tiere
Negativkontrolle (8 Tiere pro Zeitpunkt)	<i>non silencing</i> dsRNA (Luziferase-spez. dsRNA)	2, 3, 5, 10 Tagen	32
200 µg ds RNA/kg KG	eGFP-spezifische dsRNA	2 Tagen	8
200 µg dsRNA/kg KG	eGFP-spezifische dsRNA	3 Tagen	8

200 µg dsRNA/kg KG	eGFP-spezifische dsRNA	5 Tagen	8
Konzentration X	eGFP-spezifische dsRNA	10 Tagen	8
Tiere pro Experiment			64

5 Versuchsschema 3: retrobulbäre siRNA-Applikation. Bestimmung der optimalen dsRNA-Konzentration zum *post transcriptional gene silencing*.

Einmalige retrobulbäre siRNA-Injektion am Tag 0, Versuchsende am Tag 3 (KG = Körpergewicht).

Gruppe	linkes Auge	rechtes Auge	Anzahl der Tiere
Negativkontrolle 200 µg dsRNA/kg KG	<i>non silencing</i> ds RNA (Luziferase-spez. dsRNA)	<i>non silencing</i> dsRNA (Luziferase-spez. dsRNA)	8
20 µg dsRNA /kg KG	eGFP-spezifische dsRNA	eGFP-spezifische dsRNA	8
100 µg dsRNA/kg KG	eGFP-spezifische dsRNA	eGFP-spezifische dsRNA	8
200 µg dsRNA/kg KG	eGFP-spezifische dsRNA	eGFP-spezifische dsRNA	8
Tiere pro Experiment			40

10

Versuchsschema 4: retrobulbäre dsRNA-Injektion zur Bestimmung des optimalen Wirkungszeitpunktes des *post transcriptional gene silencing* (= Zeitpunkt des maximalen *gene silencing*-Effekts nach einmaliger retrobulbärer dsRNA-Applikation am Tag 0).

	dsRNA)	dsRNA)		
200 µg dsRNA/kg KG	eGFP-spezifische dsRNA	eGFP-spezifische dsRNA	0, 7, 14	24
Tiere pro Experiment				48

Literatur

5 Zitierte Literatur, deren Offenbarungsgehalt hiermit in die vorliegende Beschreibung aufgenommen wird:

- Allikmets R. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet.* 17(1):122 (1997).
- 10 • Banks CN, Hutton WK. Blindness in New South Wales: an estimate of the prevalence and some of the contributing causes. *Aust J Ophthalmol* 9:285-288 (1981).
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409(6818):363-6 (2001).
- Bressler NM, Bressler SB. Preventative ophthalmology. Age-related macular
15 degeneration. *Ophthalmology* 102:1206-1211(1995).
- Caplen N.J., Parrish S., Imani F., Fire A., and Morgan R.A. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:9742-9747 (2001).
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., and Tuschel T.
20 Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498 (2001).
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., and Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Coenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811(1998).
- Gass JD. Drusen and disciform macular detachment and degeneration. *Arch Ophthalmol* 90:206-217 (1973).
- Ghafour IM, Allan D, Foulds WS. Common causes of blindness and visual handicap in the west of Scotland. *Br J Ophthalmol* 67: 209-213 (1983).
- Grey RH, Burns-Cox CJ, Hughes A. Blind and partial sight registration in Avon. *Br J Ophthalmol* 73:88-94(1989).
- 30 • Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106(1):23-34(2001).

- Hamel CP, Tsilou E, Pfeffer BA, Hooks JJ, Detrick B, Redmond TM. Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. *J Biol Chem.* 268(21):15751-7(1993).
- 5 • Hamilton AJ and Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952(1999).
- Heiba IM, Elston RC, Klein BE, Klein R. Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Genet Epidemiol* 11:51-67 (1994).
- 10 • Hyman LG, Lilienfeld AM, Ferris FL, Fine SL. Senile macular degeneration: a case-control study. *Am J Epidemiol* 118:213-227 (1983).
- Hyman L. Epidemiology of eye disease in the elderly. *Eye* 1: 330-341 (1987).
- Illing M., Molday L.L., Molday R.S. The 220-kDa rim protein of retinal rod outer segments is a member of the ABC transporter superfamily. *J Biol Chem.* 11;272(15):10303-10 (1997).
- 15 • Kasschau KD and Carrington JC. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95:461-470(1998).
- Klein R, Klein BE, Franke T. The relationship of cardiovascular disease and its risk factors to age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 20 100:406-414 (1993).
- Knight SW and Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2: 2269-2271(2001).
- 25 • Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, Milton RC, Kini MM, Kahn HA, Nickerson RJ, Pool J, Colton TL, Ganley JP, Loewenstein JI, Dawber TR. The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Surv Ophthalmol* 24(Suppl): 335-610 (1980).
- 30 • Lewis R.A., Shroyer N.F., Singh N., Allikmets R., Hutchinson A., Li Y., Lupski J.R., Leppert M., Dean M. Genotype/Phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease. *Am J Hum Genet.* 1999 Feb;64(2):422-34 (1999).

- Meyers SM, Zachary AA. Monozygotic twins with age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 106:651-653 (1988).
- Okabe, M, Ikawa, M, Kominami, K, Nakanishi, T and Nishimune, Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters* 407:313-9 (1997).
- 5 • Paetkau ME, Boyd TA, Grace M, Bach-Mills J, Winship B. Senile disciform macular degeneration and smoking. *Can J Ophthalmol* 13:67-71 (1978).
- Piguet B, Wells JA, Palmvang IB, Wormald R, Chisholm IH, Bird AC. Age-related Bruch's membrane change: a clinical study of the relative role of heredity and environment. *Br J Ophthalmol* 77:400-403 (1993).
- 10 • Schuler GD. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med.* 75(10):694-8 (1997)
- Seddon JM, Ajani UA, Mitchel BD. Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol* 123: 199-206 (1997).
- 15 • Seeliger M.W., Grimm C., Stahlberg F., Friedburg C., Jaissle G., Zrenner E., Guo H., Reme C.E., Humphries P., Hoffmann F., Biel M., Fariss R.N., Redmond T.M., Wenzel A. New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet.* 29(1):70-4 (2001).
- Silvestri G, Johnston PB, Hughes AE. Is genetic predisposition an important risk factor in age-related macular degeneration? *Eye* 8:564-568 (1994).
- 20 • Sperduto RD, Hiller R. Systemic hypertension and age-related maculopathy in the Framingham Study. *Arch Ophthalmol* 104:216-219 (1986).
- The Eye Disease Case-Control Study Group. Risk factors for neovascular age-related macular. *Arch Ophthalmol* 110:1701-1708 (1992).
- 25 • Yap M, Weatherill J. Causes of blindness and partial sight in the Bradford Metropolitan District from 1980 to 1985. *Ophthalmic Physiol Opt* 9:289-292 (1989).
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33(2000).

Patentansprüche

1. Verfahren zur spezifischen Hemmung der Expression vorgegebener Zielgene in Zellen und Geweben des Auges, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) außerhalb des Retina-Bereichs der Blut/Retina-Schranke appliziert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
 - a) ein oder mehrere doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) eingeführt werden, welche die RNA-Interferenz der korrespondierenden mRNA von einem oder mehreren der Zielgene vermitteln, so dass die Degradation der korrespondierenden mRNA in der Zelle oder des Gewebes erfolgt, wodurch es zur Bereitstellung einer Zelle oder eines Gewebes kommt, welches eines oder mehrere der eingeführten dsRNA-Moleküle enthält;
 - b) es zur Aufrechterhaltung der Zelle oder des Gewebes aus a) unter Bedingungen kommt, unter denen die Degradation der mRNA-Moleküle von einem oder mehreren der Zielgene erfolgt, wobei RNA-Interferenz der mRNA-Moleküle der korrespondierenden Zielgene in der Zelle oder dem Gewebe stattfindet.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass
 - a) ein oder mehrere doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) eingeführt werden, welche die RNA-Interferenz der korrespondierenden mRNA von einem oder mehreren Gen vermitteln, so dass die Degradation der korrespondierenden mRNA in der Zelle, des Gewebes oder des Organismus erfolgt, wodurch es zur Bereitstellung einer Testzelle, eines Testgewebes oder eines Testorganismus kommt;
 - b) es zur Aufrechterhaltung der Zelle des Gewebes aus a) unter Bedingungen kommt, unter denen die Degradation der mRNA-Moleküle von einem oder mehreren der Gene erfolgt, wodurch es zur Bereitstellung einer Testzelle oder eines Testgewebes kommt, in der die mRNA von einem oder mehreren der Gene degradiert ist; und
 - c) die Beobachtung des Phänotyps der in b) hergestellten Testzelle oder des Testgewebes möglich ist, und, optional, der Vergleich des beobachteten Phänotyps mit demjenigen einer geeigneten Kontrollzelle oder eines Kontrollgewebes, wodurch Informationen über die Funktionen der Gene möglich sind.

14. Ein „knockdown“-Organismus aus Anspruch 11, wobei der Organismus eine retinale Erkrankung nachbildet.
15. Ein „knockdown“-Organismus aus Anspruch 11, wobei der Organismus eine
5 degenerative retinale Erkrankung nachbildet.
16. Ein „knockdown“-Organismus aus den Ansprüchen 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Organismus um ein Wirbeltier handelt.
- 10 17. Ein „knockdown“-Organismus aus den Ansprüchen 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Organismus um ein Säugetier handelt.
18. Medikament . bzw. pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung einer
15 Augenerkrankung, dadurch gekennzeichnet, dass die Applikation des Medikamentes außerhalb des retina-Bereiches der Blut/Retina-Schranke erfolgt.
19. Medikament nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet dass
 - a) es ein oder mehrere doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) enthält, welche
20 die RNA-Interferenz der korrespondierenden mRNA von einem oder mehreren Zielgenen vermitteln, deren eingeschränkte Funktionen für eine Augenerkrankung ursächlich sind;
 - b) es zur Aufrechterhaltung der RNA-Interferenz aus a) unter Bedingungen kommt,
unter denen die Degradation der mRNA-Moleküle von einem oder mehreren der
für die Augenerkrankung ursächlichen Zielgene erfolgt.
- 25 20. Medikament nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet dass
 - a) es ein oder mehrere doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) enthält, welche
die RNA-Interferenz der korrespondierenden mRNA von einem oder mehreren
Zielgenen vermitteln, wodurch der negative Effekt eines oder mehrerer in ihrer
30 Funktion eingeschränkter Gene, die für eine Augenerkrankung ursächlich sind,
effizient ausgeglichen wird;
 - b) es zur Aufrechterhaltung der RNA-Interferenz aus a) unter Bedingungen kommt,
unter denen die Degradation der mRNA-Moleküle von einem oder mehreren
Zielgenen erfolgt, wodurch der negative Effekt eines oder mehrerer in ihrer

5 21. Medikament nach den Ansprüchen 19 und 20 zur Behandlung einer Krankheit des Augenhintergrundes.

22. Medikament nach den Ansprüchen 19 und 20 zur Behandlung einer retinalen Erkrankung.

10 23. Medikament nach den Ansprüchen 19 und 20 zur Behandlung einer degenerativen retinalen Erkrankung.

24. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der Zielgene spezifisch im Auge exprimiert werden.

15 25. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der Zielgene spezifisch in Geweben des Augenhintergrundes exprimiert werden.

26. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der Zielgene spezifisch in der Retina exprimiert werden.

20 27. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der Zielgene spezifisch im Retinalen Pigmentepithel exprimiert werden.

28. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle zwischen 21 und 23 Nukleotiden lang sind.

25 29. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle eine terminale 3'-Hydroxylgruppe enthalten.

30 30. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle chemisch synthetisiert wurde.

31. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle ein Analog einer natürlich vorkommenden RNA darstellt.
- 5 32. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle sich unterscheidet von dem entsprechenden dsRNA-Analogon aus den Ansprüchen 23 bis 26 durch die Addition, Deletion, Substitution oder der Modifikation eines oder mehrerer Nukleotide.
- 10 33. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle das korrespondierende Gen durch „transcriptional silencing“ hemmt.
34. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle durch einen Vektor kodiert wird.
- 15 35. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der dsRNA-Moleküle durch einen geeigneten Carrier in Zellen oder Geweben des Auges eingebracht werden, dadurch gekennzeichnet, dass die Applikation außerhalb der Blut/Retina-Schranke erfolgt.
- 20 36. Verfahren nach Anspruch 35, wobei es sich bei dem Carrier um Adeno-assoziiertes Virus (AAV) handelt.
- 25 37. Verfahren nach Anspruch 35, wobei der Carrier dadurch gekennzeichnet ist, dass
 - a) beispielsweise eine Verpackung der dsRNA in micellare Strukturen, vorzugsweise Liposomen, vorliegt;
 - b) beispielsweise eine Bindung der dsRNA an kationische Porphyrine, kationische Polyamine, polymere DNA-bindende Kationen oder fusogene Peptide, vorliegt;
 - 30 c) beispielsweise eine Assoziation oder Verpackung der dsRNA in ein von einem Virus wie das Cytomegalovirus (CMV) abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes Hüllprotein vorliegt.

☐ Photographs capable of illustration, drawing(s) _____.